

517 774

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 janvier 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/003181 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Péters-  
bourg, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002010

(22) Date de dépôt international : 27 juin 2003 (27.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

2,391,638 28 juin 2002 (28.06.2002) CA

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28 rue du Docteur  
Roux, F-75724 Cedex 15 PARIS (FR). CELOGOS  
[FR/FR]; 25-28 rue du Docteur Roux, F-75015 PARIS  
(FR). FONDATION DE L'AVENIR [FR/FR]; 28 rue  
Beaunier, F-75014 PARIS (FR). CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue  
Michel-Ange, F-75794 Cedex 16 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MONTAR-  
RAS, Didier [FR/FR]; 48 rue Ernest Renan, F-92310  
SEVRES (FR). BORENSTEIN, Nicolas [FR/FR]; 28  
rue Beaunier, F-75014 PARIS (FR). PINSET, Christian  
[FR/FR]; 2 rue Doudeauville, F-75018 PARIS (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ANIMAL OR HUMAN ADULT STEM CELLS AND THERAPEUTIC USE THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE CELLULES SOUCHES ADULTES ANIMALES OU HUMAINES ET UTILI-  
SATION DESDITES CELLULES SOUCHES EN THERAPIE.

(57) Abstract: The invention relates to tissue regeneration and repair by cell transplant. More particularly, the invention concerns a method for preparing adult stem cells which preserves the diversity and plasticity of said cells. The invention also concerns the use of said stem cells obtained by the inventive extraction method for therapeutic uses, including gene and cell therapy. The inventive preparation method essentially consists in: cell extraction, mechanical dissociation, enzymatic dissociation, maintaining the cells obtained in a specific culture medium enabling preservation of diversity and plasticity, said method excluding cell culture.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au domaine de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellu-  
laire. Plus particulièrement, la présente invention vise un procédé de préparation de cellules souches adultes qui préserve la diversité  
et la plasticité de ces cellules. La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé d'extrac-  
tion proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique et cellulaire. Le procédé de préparation selon l'invention  
consiste essentiellement en : l'extraction cellulaire, la dissociation mécanique, la dissociation enzymatique, le maintien des cellules  
obtenues dans un milieu de culture spécifique permettant de préserver la diversité et la plasticité, ledit procédé excluant la mise en  
culture des cellules.

WO 2004/003181 A2

**PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE CELLULES SOUCHES ADULTES  
ANIMALES OU HUMAINES ET UTILISATION DESDITES CELLULES  
SOUCHES EN THÉRAPIE.**

5

**DOMAINE DE L'INVENTION**

La présente invention se rapporte au domaine de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellulaire. Plus particulièrement, la présente invention vise un procédé de préparation de cellules souches adultes qui préserve la diversité et la plasticité de ces cellules. La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé d'extraction proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique et cellulaire.

**DESCRIPTION DE L'ART ANTÉRIEUR**

Pour des raisons anatomiques et biologiques, le sang et ses dérivés ont été les premières cellules transplantées. Les greffes de cellules hématopoïétiques ont connu un chemin semblable. Depuis une vingtaine d'années, le transfert de cellules neuronales foetales est étudié comme approche thérapeutique dans les pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et plus récemment dans la chorée de Huntington. Les résultats cliniques sont cohérents et montrent une nette amélioration. La limitation majeure de cette dernière approche est la source de cellules transplantées. En effet, le recours à des cellules neuronales foetales rend difficile la diffusion de ce type d'approches thérapeutiques. Les autogreffes de kératinocytes constituent une solution thérapeutique dans les cas de brûlures graves. Un avantage de ce système : la capacité des kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, à être cultivées *ex vivo*. Dans le même ordre d'idée, des cartilages défectueux ont pu être reconstruits par des chondrocytes amplifiés en culture puis greffés sous arthroscopie. Des approches similaires encore très expérimentales sont aussi en cours pour des organes comme le pancréas et le foie.

Ces données, encore trop restreintes, démontrent le potentiel de la médecine régénératrice par thérapie cellulaire. Les limitations à

l'extension de ces approches sont de plusieurs natures. Pour être capable de suppléer aux défaillances d'un tissu par thérapie cellulaire il faut disposer de sources cellulaires répondant aux caractéristiques suivantes :

- les cellules doivent être faciles à prélever ;
- 5       - elles doivent survivre aux sites d'injection ;
- elles doivent présenter une bonne capacité de prolifération et de colonisation ;
- elles doivent être capables de se différencier pour obtenir un résultat fonctionnel.

10               Il existe donc un besoin pour de nouveaux procédés permettant d'obtenir des cellules souches aptes à être utilisées, entre autres, dans le cadre de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellulaire.

### **SOMMAIRE DE L'INVENTION**

15               La présente invention propose un procédé de préparation cellulaire répondant au besoin mentionné précédemment. Plus particulièrement, la présente invention vise un procédé de préparation cellulaire capable de préserver la diversité et la plasticité des cellules souches de vertébrés provenant préférentiellement d'une biopsie tissulaire pour leur utilisation ultérieure dans le cadre d'une régénération ou réparation tissulaire par trans-  
20       plantation dans un animal, tel un être humain.

L'invention vise de plus un milieu de culture défini, particulièrement utile lors de la mise en œuvre du procédé de préparation cellulaire.

25               La présente invention vise aussi la préparation cellulaire ou les cellules souches obtenues par le procédé de préparation de l'invention.

La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé de préparation proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique ou cellulaire.

30               La présente invention vise aussi une composition cellulaire comprenant des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de préparation de l'invention.

La présente invention porte également sur un procédé de préparation de cellules souches capables de réparer ou de régénérer *in vivo* des tissus ou des organes d'un vertébré.

5 La présente invention porte aussi sur une méthode de traitement, caractérisée par l'implantation de cellules souches animales autologues ou hétérologues obtenues selon le procédé de l'invention chez un animal.

L'originalité de la présente invention porte sur le fait que, contrairement aux procédés de préparation cellulaire utilisés dans le domaine, le procédé de préparation de la présente invention permet :

- 10 - d'extraire les cellules dans des conditions définies sans protéine animale d'origine extractive, donc dans des conditions sûres du point de vue sanitaire ;
- de maintenir la viabilité cellulaire par l'utilisation de molécules anti-oxydantes et anti-apoptotiques ;
- 15 - de préserver la diversité cellulaire ;
- de maintenir le potentiel de plasticité cellulaire ;
- de maintenir le potentiel de différenciation ;
- d'améliorer l'implantation, la colonisation et la différenciation des cellules greffées ; et
- 20 - de procéder à une transplantation des cellules sans avoir à passer par une étape d'expansion en culture *in vitro*.

Par exemple, dans le procédé de préparation cellulaire décrit dans l'article de Pouzet *et al.* (2000. Circulation. 102 : III2210-5), il n'y a pas d'extraction ou d'isolement cellulaire selon un procédé de digestion enzymatique. Alternativement, le tissu musculaire est haché. De plus, il n'y a pas  
25 d'étape de préparation de cellules telle qu'entendue au sens de la présente invention. La conclusion de cette étude est d'ailleurs à l'effet qu'il ne serait pas possible de court-circuiter la phase d'expansion en culture *in vitro*, la récupération fonctionnelle telle que discutée dans l'article de Pouzet *et al.* dépendant  
30 plutôt du nombre de cellules. Selon le procédé de l'invention, le mode de préparation des cellules conduit avantageusement, sans expansion en culture

*in vitro*, à une colonisation très importante ainsi qu'à une récupération fonctionnelle rapide de l'organe traité.

### DESCRIPTION DES FIGURES

Les Figures 1 à 5 sont des microphotographies illustrant la mise en évidence de cellules de muscle greffées dans le cœur de brebis. Les cellules ont été obtenues par dissociation enzymatique d'une biopsie de muscle squelettique puis directement implantées, sans phase d'expansion en culture *in vitro*, dans le myocarde de la même brebis (greffe autologue). La présence de cellules de muscle squelettique est révélée à l'aide de l'anticorps MY32 qui reconnaît spécifiquement la chaîne lourde de myosine squelettique.

La Figure 1 illustre la détection de cellules de muscle squelettique greffées avec l'anticorps MY32 par la présence, à l'intérieur de la paroi du myocarde, de zones de greffes massives (2 à 9 mm de diamètre) ou de foyers discrets (barre d'échelle, 250 microns).

La Figure 2 illustre l'immunodétection de cellules de muscle squelettique avec l'anticorps MY32. Dans la paroi du myocarde, les fibres marquées par l'anticorps MY32 sont généralement alignées avec le réseau de cardiomyocytes natifs. Certaines fibres sont intensément marquées alors que d'autres ne sont que faiblement marquées; les cardiomyocytes natifs ne sont pas marqués (Barre d'échelle, 500 microns).

La Figure 3 montre des cellules greffées se différenciant en fibres musculaires et formant des sarcomères organisés (Barre d'échelle, 25 microns).

La Figure 4 illustre la spécificité immunohistochimique de l'anticorps MY32.

Coin supérieur gauche : détection immunohistochimique avec l'anticorps MY32 dans le muscle squelettique de brebis. On note les fibres intensément marquées (« *fast twitch* ») (en brun foncé) et les fibres faiblement marquées (« *slow twitch* ») caractéristiques d'une biopsie musculaire (barre d'échelle, 25 microns).

Coin supérieur droit : détection immunohistochimique avec l'anticorps MY32 dans le myocarde de brebis greffé avec des cellules n'ayant pas subi de mise en culture *in vitro* (barre d'échelle, 25 microns).

5 Coin inférieur gauche : témoin immunohistochimique négatif avec l'anticorps MY32 dans un cœur de brebis normal (barre d'échelle, 250 microns).

Coin inférieur droit : témoin immunohistochimique négatif avec l'anticorps MY32 dans un cœur de brebis injecté avec du milieu seul (barre d'échelle, 250 microns).

10 La Figure 5 illustre la co-détection de cellules de muscle squelettique greffées et de cardiomyocytes avec l'anticorps MY32 et un anticorps dirigé contre la connexine-43, protéine spécifique aux « *gap junctions* » ou jonctions communicantes (points rouges). Cet essai n'a pas démontré la présence de connexine-43 à l'intérieur des cellules greffées ou entre les  
15 cellules greffées et leur microenvironnement.

### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente invention porte donc sur la mise au point d'un procédé de préparation de cellules souches animales ou humaines qui préserve la diversité et la plasticité de ces cellules provenant  
20 d'une biopsie tissulaire pour leur utilisation ultérieure dans le cadre d'une régénération ou réparation tissulaire par transplantation directe des cellules, sans expansion en culture *in vitro*, ainsi préparées chez un animal ou chez l'homme.

Ainsi, il est entendu que la préparation initiale provenant d'une  
25 biopsie tissulaire est hétérogène ; par exemple, celle provenant d'une biopsie de muscle squelettique peut contenir des myoblastes, fibroblastes, adipocytes, cellules nerveuses périphériques, cellules endothéliales et cellules de muscle lisse, en plus des cellules souches pluripotentes.

#### i) Définitions

30 Par « cellule souche », on entend les cellules qui ont à la fois la capacité de s'autorenouveler et la capacité de se différencier en différents types de précurseurs cellulaires.

Par « diversité des cellules souches », on entend les cellules souches qui sont classées en fonction de leur stade de développement et de leur origine tissulaire. Plus particulièrement, on entend une classification de cellules souches embryonnaires ou adultes en fonction de leur origine tissulaire, par exemple, les cellules souches de la peau ou neuronales ou du muscle.

Par « plasticité des cellules souches », on entend la capacité pour ces cellules de traverser les frontières de lignée, par exemple la capacité des cellules hématopoïétiques à se différencier en hépatocytes.

10 Par « régénération tissulaire », on entend la capacité à reformer un tissu soit par activation des cellules progénitrices du tissu (par exemple tissu de la peau, du foie, du cœur, de l'os ou de tissus nerveux), soit par transplantation directe, sans expansion en culture *in vitro*, de ces cellules progénitrices. Plus particulièrement, il s'agit alors d'une néoformation tissulaire.

15 Par « réparation tissulaire », on entend une opération qui permet de pallier un déficit sans avoir recours à un processus de régénération. La réparation tissulaire se traduit par un apport exogène de cellules qui peuvent être différentes des cellules du tissu receveur.

20 Par « transplantation cellulaire », on entend une opération qui se caractérise par un apport de cellules isolées. Cette transplantation peut être effectuée, par exemple, par injection directement, sans expansion en culture *in vitro*, dans le tissu ou dans la circulation afférente.

25 Par « animal », on entend tout organisme vivant qui peut être sujet à une transplantation cellulaire, et ceci inclut les êtres vertébrés tels que notamment les êtres humains, les animaux domestiques et sauvages, notamment les oiseaux.

## **ii) Procédé de préparation de cellules souches**

30 Un premier aspect de la présente invention vise un procédé de préparation de cellules souches humaines ou animales. Ce procédé consiste essentiellement en les étapes suivantes :

a) l'extraction cellulaire ;

- b) la dissociation mécanique ;
- c) la dissociation enzymatique ; et

le maintien des cellules dans un milieu spécifique permettant de préserver la diversité et la plasticité, ledit procédé excluant la mise en culture des cellules, c'est-à-dire une phase d'expansion en culture *in vitro*.

Plus précisément, l'extraction cellulaire est obtenue tout d'abord suite à une biopsie pour fournir un fragment tissulaire, tel un fragment de muscle, de foie ou de peau. Par exemple, une biopsie musculaire est réalisée sous anesthésie locale suite à une incision ou encore à l'aiguille. Le fragment tissulaire ainsi obtenu est ensuite humidifié dans un milieu défini, tel le DME/202 en présence de facteurs protecteurs et de facteurs inhibant la différenciation cellulaire (Pinset et Montarras), (1994) *Cell Biology : A laboratory Handbook*. Academic Press).

Préférentiellement, le milieu défini est un milieu ci-après nommé DPM (*Diversity Protecting Medium*) et comprend au moins :

- un milieu nutritif de base tamponné avec des tampons dépendants ou indépendants de la concentration en CO<sub>2</sub>. Les milieux utilisés sont, dans la plupart des cas, constitués d'un mélange dans un rapport 1:1 de milieu de type DME et de type F12. Parmi ceux-ci on peut citer en exemple le mélange DME/ F12 et DME/MCDB 202;
- un facteur protecteur, tel :
  - des anti-oxydants (acide ascorbique, N-acétyl cystéine)
  - des anti-caspases (Dose : environ 0,1 mU à 10 mU)
  - des protecteurs du métabolisme (L-Carnitine)
  - des facteurs protecteurs des métaux (Transferrine) (Dose : environ 0,1 µg/ml à 100 µg/ml)
- des hormones tels glucocorticoïdes, insuline, acide rétinoïque, hormone thyroïdienne, minéralocorticoïdes, IGF1 ou IGF2 aux doses physiologiques allant préférentiellement de 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-9</sup> M.
- des facteurs inhibant la différenciation, tels :
  - les FGF (*Fibroblast Growth Factors*). Parmi les facteurs de la famille FGF, trois facteurs sont particulièrement importants et jouent un



rôle similaire, soit FGF-2, FGF-6 et FGF-10. Chacun des facteurs de la famille FGF est employé à des concentrations allant préférentiellement de 0,1 à 100 µg/ml.

5 > l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Dose : environ 0,1 µg/ml à 100 µg/ml)

> le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Dose : environ 0,1 µg/ml à 100 µg/ml) [fraction non cellulaire du sang après coagulation]

> le sérum est également un facteur inhibant la différenciation et peut être utilisé à une concentration variant de 0 à 100 %.

10 Ce milieu DPM ainsi défini est utilisé lors du procédé de préparation cellulaire. L'absence de fluide animal dans le milieu défini, comme le sérum par exemple, permet de garantir une meilleure sécurité infectieuse contre des virus, prions, etc. et une meilleure reproductibilité du procédé de l'invention. Les prélèvements provenant de biopsies sont maintenus soit à  
15 température ambiante, soit conservés, préférentiellement, entre 4 et 6°C dans le DPM pendant une période n'excédant préférentiellement pas 48 heures. Il est clair que la composition précise du DPM pourra varier en fonction du type de biopsie tissulaire.

Lors de l'étape b) du procédé, le fragment tissulaire maintenu  
20 dans le milieu DPM est d'abord émincé jusqu'à l'obtention d'un homogénat cellulaire. Ceci est préférentiellement fait à l'aide de ciseaux chirurgicaux stériles mais tout autre outil semblable peut être utilisé. Par la suite, l'extrait tissulaire homogène ou l'homogénat tissulaire est préférentiellement libéré d'une partie des érythrocytes et des adipocytes grâce à une étape de lavage et de centri-  
25 furation par sédimentation douce de 1 à 10 g (Pinset et Montarras. 1994. *Cell Biology : A Laboratory Handbook*. Academic Press).

À l'étape c) du procédé, l'homogénat tissulaire obtenu à l'étape b) est soumis à une digestion enzymatique pour optimiser la dissociation cellulaire. Lors de cette étape du procédé de l'invention, des enzymes  
30 protéolytiques d'origine bactérienne, comme la collagénase et/ou la pronase, sont préférentiellement utilisées. Toutefois, pour des raisons de sécurité sanitaire, on peut envisager l'utilisation de trypsine produite par génie génétique

ou de toute autre enzyme acceptable. Ces enzymes peuvent être utilisées seules ou en combinaison à des concentrations variant, préférablement, de 0,1 à 0,5%.

À titre d'exemple non limitatif, on peut procéder comme suit, lors de la mise en œuvre de l'étape c) du procédé :

le culot de fragments tissulaires obtenu à l'étape b) est suspendu dans du milieu DPM additionné de collagénase à une concentration finale de 0,4 g par 100 ml. La digestion enzymatique allant de 5 à 20 minutes peut être répétée plusieurs fois. La température de la réaction enzymatique se situe préférablement entre 20°C et 37°C avec agitation externe. La digestion enzymatique a lieu préférablement en plusieurs étapes, et ce, jusqu'à cinq étapes. À chaque étape, les fragments et les cellules sont séparés par centrifugation ménagée à 10 g. Le culot de fragments est alors resuspendu dans le milieu DPM additionné d'enzymes protéolytiques puis soumis à une nouvelle étape de digestion. Les cellules présentes dans le surnageant sont récoltées par centrifugation à 200 g et resuspendues dans du milieu DPM. On aboutit ainsi à une suspension cellulaire qui additionne les cellules extraites des différentes étapes de digestion. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur filtre de nylon dont le diamètre des pores est préférablement d'environ 34 microns, pour éliminer les fragments tissulaires.

Ainsi, grâce au procédé de préparation de cellules souches selon la présente invention, il est possible, par exemple, de préparer de manière sûre et reproductible, sans expansion en culture *in vitro*, une suspension cellulaire issue d'une biopsie musculaire qui maintient son potentiel de colonisation et de plasticité cellulaire. Par exemple, pour un gramme de tissu, il est possible de préparer de  $1 \times 10^6$  à  $2 \times 10^6$  cellules. L'efficacité des procédés pour le maintien de la diversité et de la plasticité cellulaire est évaluée par des tests *in vivo* et des tests *ex vivo*. Dans les premiers, les suspensions cellulaires obtenues sont réintroduites dans l'animal après un marquage. À titre d'exemple une molécule fluorescente comme la *Green Fluorescent Protein* sera employée. Le marquage cellulaire permet de suivre le devenir des cellules injectées dans l'organisme, d'analyser leur participation aux diffé-

rents tissus et la différenciation des cellules injectées. Dans les conditions où l'on maintient la diversité et la plasticité, les cellules injectées participent à la néoformation de différents tissus comme le muscle squelettique et cardiaque, les vaisseaux, les tendons, le cartilage, l'os, le tissu hématopoïétique. Cette  
5 diversité et cette plasticité cellulaire est dépendante du site d'injection soulignant l'importance de l'environnement dans le devenir cellulaire.

Les tests *ex vivo* (en culture) permettent aussi de mesurer la diversité cellulaire et la plasticité cellulaire. Ceux-ci sont basés sur l'analyse clonale et sur la réponse à différents inducteurs de la différenciation. Parmi  
10 ceux-ci on peut citer :

- ✓ des facteurs de croissance comme l'insuline et les IGFs, les TGFs, les BMPs, le VEGF ;
- ✓ des hormones comme les dérivés de l'acide rétinoïque, les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes ;
- 15 ✓ des facteurs de la matrice extracellulaire ;
- ✓ des vitamines et agents permettant la minéralisation ;
- ✓ les composants de la matrice extracellulaire.

L'identification cellulaire est faite par des analyses immunologiques à l'aide de coloration spécifique et d'anticorps spécifiques, qui  
20 permettent à la fois l'identification et la quantification et par l'analyse transcriptomique.

Les approches complémentaires *in vivo* et *ex vivo* permettent de mesurer la diversité et la plasticité cellulaire qualitativement et quantitativement et d'ainsi valider les conditions permettant le maintien de la diversité  
25 cellulaire et de la plasticité cellulaire.

Les cellules ainsi préparées sans expansion en culture *in vitro* sont une source de cellules adéquates pour la thérapie cellulaire et peuvent être soit réimplantées directement dans un organisme, soit conservées pour réimplantation ultérieure.

30 Le procédé de la présente invention peut comprendre une étape additionnelle, soit une étape de congélation. Cette étape optionnelle du procédé offre les avantages suivants :

- ✓ conservation des prélèvements tissulaires ;
  - ✓ dissociation entre la préparation de la biopsie et la réimplantation cellulaire ;
  - ✓ caractérisation biologique et sanitaire avant le réimplanta-
- 5 tion cellulaire.

À titre d'exemple non limitatif, on peut procéder comme suit lors de cette étape de congélation :

10  $10^6$  à  $2 \times 10^6$  cellules provenant de 1 gramme de tissu sont mises en présence de milieu DPM additionné d'agents cryopréservatifs, tel le DMSO. Pour le DMSO, la concentration utilisée est préférablement de 10%. Dans ces conditions, les cellules sont maintenues à 20°C pour une période de 10 minutes puis la température est amenée lentement, en quelques heures, à moins 80°C. Finalement, les cellules sont transférées dans de l'azote liquide. Il est important de noter que ces conditions de conservation ont l'avantage de

15 ne pas modifier les caractéristiques cellulaires.

Avant de procéder à la transplantation cellulaire dans le cadre des futures applications cliniques, il peut être préférable de caractériser la suspension cellulaire obtenue par le procédé selon la présente invention. Cette caractérisation peut être entreprise au niveau protéique grâce à

20 l'utilisation de marqueurs cellulaires tels que :

- P-Cam comme marqueur de cellule endothéliales ;
  - N-Cam comme marqueur de cellule neuronales et musculaires;
  - Actine de muscle lisse comme marqueur de cellules du
- 25 muscle lisse ;
- GFAP comme marqueur de cellules gliales ;
  - Myf5, Pax3, Pax7, C-met et M-cadhérine comme marqueurs de cellules musculaires ;
  - Sca1+, C-Kit, CD45 et CD34 comme marqueurs de
- 30 cellules souches.

Cette caractérisation peut également être entreprise au niveau de la transcription par l'utilisation de biopuces contenant des oligo-

nucléotides codant pour des gènes cellulaires (par exemple, facteurs de transcription spécifiques et facteurs de la machinerie du cycle cellulaire) permettant d'identifier les cellules de la suspension cellulaire.

Conformément à l'invention, lesdites cellules souches sont  
5 des cellules souches animales ou humaines choisies dans le groupe constitué par des cellules souches progénitrices d'un tissu.

Egalement conformément à l'invention, le tissu est choisi dans le groupe constitué par la peau, le foie, le cœur, l'os et les tissus nerveux.

### iii) Utilisations thérapeutiques

10 Un deuxième aspect de la présente invention vise l'usage d'une suspension cellulaire ou de cellules souches obtenues par le procédé de l'invention dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique, suite à une transplantation de ces cellules chez un être humain, par exemple. Plus particulièrement, la présente invention propose d'utiliser les cellules  
15 préparées par le procédé de l'invention dans le cadre d'une réparation et/ou régénération tissulaire par transplantation cellulaire sans expansion en culture *in vitro*. Les cellules ainsi préparées seront également utilisées comme vecteurs en thérapie génique.

Par exemple, les cellules souches adultes obtenues par le  
20 procédé de préparation selon l'invention peuvent servir dans le cadre d'une réparation de tissu osseux. Dans le cas présent, il s'agit de transplanter directement, sans expansion en culture *in vitro*, les cellules sur un site de réparation osseuse. Dans ce micro-environnement particulier, les cellules ou certaines d'entre elles peuvent adopter le phénotype osseux et ainsi participer  
25 à la réparation du tissu endommagé.

Le procédé de préparation cellulaire de la présente invention peut également fournir une suspension de cellules souches adultes de mammifère pouvant être utilisée lors d'une restauration du potentiel hématopoïétique. En effet, la capacité des cellules souches de biopsie musculaire à  
30 coloniser la moelle osseuse de souris irradiées et à contribuer à toutes les lignées hématopoïétiques, oblige à considérer le potentiel réparateur des cellules de biopsie musculaire dans le cas, par exemple, de leucémies.

D'autre part, il est connu que les greffes de cellules musculaires cultivées, dans le muscle sont peu efficaces et caractérisées par une mort massive des cellules réimplantées dans les heures qui suivent leur injection. Il est par conséquent proposé que le procédé de préparation de cellules  
5 souches selon l'invention qui ne comporte pas de phase d'expansion en culture *in vitro* peut contribuer à la réparation du tissu musculaire. Les cellules contenues dans la suspension pourront répondre aux micro-environnements et ainsi restaurer des fonctions ou réparer le tissu musculaire.

En conséquence, l'invention a également pour objet  
10 l'utilisation des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies par thérapie cellulaire ou thérapie génique.

La présente invention a, en outre, pour objet, une cellule souche obtenue selon le procédé selon l'invention.

15 La présente invention a également pour objet une méthode de traitement comprenant une étape d'implantation de cellules souches animales autologues ou hétérologues obtenues selon le procédé selon l'invention chez un animal ou chez l'homme.

La présente invention a également pour objet une composition  
20 cellulaire comprenant des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé selon l'invention.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ladite composition, les cellules souches ont une capacité de colonisation et une capacité à permettre une récupération fonctionnelle.

## 25 **EXEMPLE**

L'exemple qui suit sert à illustrer l'étendue de l'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectuées sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puisse utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la présente  
30 invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

## **Exemple 1 : Réparation du tissu cardiaque**

### **Introduction**

A la différence du muscle squelettique, le tissu cardiaque ne possède pas à l'état adulte de cellules souches capables de réparer ce tissu après une lésion. De ce fait, l'ischémie cardiaque est toujours accompagnée d'une insuffisance de contraction qui, si importante, conduit à l'insuffisance cardiaque. L'objectif de la thérapie cellulaire dans cette indication est de restaurer la fonction de contraction. Des expériences dans ce sens ont été conduites chez l'Homme avec comme source de cellules, des cellules musculaires amplifiées en culture. Cette première démarche montre la faisabilité de l'approche, mais aussi, certaines limitations de la stratégie adoptée. L'amplification d'un grand nombre de cellules musculaires dans des milieux comprenant des fluides animaux tel le sérum de veau fœtal, et leur transplantation dans un tissu hétérotypique sont des opérations à la fois lourdes et non sans danger sanitaire potentiel (contaminants viraux, prions, etc.). La limitation essentielle de ce procédé réside dans le fait que les cellules ainsi injectées ont une plasticité restreinte qui ne donnent que des cellules musculaires squelettiques. Le procédé de préparation de cellules souches de la présente invention sans phase d'expansion en culture *in vitro* évite l'appauvrissement de la diversité cellulaire par la culture.

### **Description de la transplantation cardiaque chez la brebis**

Protocole anesthésique : prémédication avec du midazolam, induction à l'aide d'étomidate, intubation trachéale et ventilation à pression positive avec de l'isoflurane dans 100% d'oxygène. La surveillance est assurée par électrocardioscopie, pression artérielle invasive, capnographie. Analgésie postopératoire avec de la bupivacaïne (bloc intercostal lors de thoracotomie), morphine et de la flunixinine méglumine.

Biopsie du muscle squelettique : Une biopsie du muscle squelettique (approximativement 10 g) est explantée stérilement à partir des biceps fémoraux gauches de chaque brebis. Le tissu ainsi prélevé est maintenu dans du DMEM (SIGMA) ou du DPM, tel que défini ci-dessus, à température de la pièce jusqu'à digestion mécanique ou enzymatique. La plaie de

l'animal est refermée de la façon habituelle. Les animaux récupèrent pendant environ trois heures, puis sont ré-anesthésiés lorsque les cellules sont prêtes à être réimplantées.

Extraction des cellules musculaires : Les explants de muscle squelettique sont pesés puis lavés dans du DMEM ou du DPM. Le tissu adipeux et *fascia* sont retirés et le muscle est émincé aux ciseaux jusqu'à l'obtention d'un homogénat tissulaire. Les fragments de muscle sont ensuite sédimentés dans du DMEM ou du DPM à 300 rpm pendant 2 minutes puis débarrassés du surnageant.

Afin de libérer les cellules satellites, les fragments de muscle sont incubés à 37°C avec agitation dans 10 mL de DMEM ou de DPM additionné de 0,4% (P/V) de collagénase (Type IA, SIGMA) brute. Après 20 minutes, les fragments sont centrifugés à 300 rpm pendant 2 minutes.

Le surnageant contenant les cellules isolées est conservé dans du DMEM à 20 % (V/V) de sérum de veau fœtal ou du DPM. Le culot subit jusqu'à quatre digestions supplémentaires (Pinset, C. et Montarras, D. Cell Systems for Ex-vivo Studies of Myogenesis : A Protocol for the Isolation of Stable muscle cell populations from newborn to adult mice dans *Cell Biology : A Laboratory Handbook* ; deuxième édition e. J. F. Celis, Academic Press ; 1998).

Les cellules extraites sont ensuite filtrées sur un filtre de nylon avec pores de 250 µm de diamètre (Polylabo SA). Les cellules ainsi préparées ne subissent pas de phase d'expansion en culture *in vitro*.

Marquage des cellules : Afin de marquer leurs noyaux, les cellules sont resuspendues dans 10 mL de DMEM sans sérum contenant 25 µg/mL de 4'-6-diamino-2-phénylindole (DAPI, SIGMA) pendant 10 minutes ou du DPM dans les mêmes conditions. Les cellules sont rincées quatre fois dans du DMEM ou du DPM afin d'enlever le DAPI. Les cellules mononucléées sont dénombrées avec une cellule de numération sous microscopie à fluorescence. La préparation cellulaire est ensuite resuspendue dans 1,2 mL de DMEM ou de DPM sans sérum et conservée à 4°C jusqu'à l'implantation sans subir de phase d'expansion en culture *in vitro*.



*Greffe cellulaire* : Les brebis préalablement anesthésiées selon la méthode décrite ci-dessus sont placées en décubitus latéral droit pour une thoracotomie gauche sur le 5ème espace intercostal. Après pericardiotomie et suspension du péricarde, les cellules dans du DMEM ou du DPM sont injectées (0,1 mL par site) à l'aide d'une seringue à insuline connectée à un épijet 27 G, sur 10 zones du ventricule gauche. Une cartographie des vaisseaux coronaires est établie pour repérer les sites d'injection dans le myocarde. Des points de sutures épicaudiques de repérage sont réalisés pour au moins deux injections. Le thorax est refermé de la manière habituelle et les animaux récupèrent sous régime analgésique (morphine à 0,5 mg/kg IM BID, flunixin 1 mg/kg IM une fois) jusqu'au lendemain inclusivement.

*Cultures cellulaires témoins* : Afin de confirmer la présence de cellules précurseurs du muscle dans la préparation cellulaire, un échantillon de 100 µL de la suspension cellulaire est ensemencé dans une boîte de culture contenant du DMEM ou du DPM avec sérum de veau fœtal. Les cellules sont maintenues à titre de témoin dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Trois à sept jours suivant l'ensemencement, les cellules servent à une immunodétection du facteur de régulation spécifique MyoD (DAKO) telle que décrite par Montarras, D. *et al.* (Cultured Myf5 Null and MyoD Null Muscle Precursor Cells Display Distinct Growth Defects. Biol Cell 2000 ;92 :565-72).

## Résultats

La procédure d'injection cellulaire n'a pas d'effet sérieux sur les animaux. Une arythmie ventriculaire survient lors de l'insertion de l'aiguille et lors de l'injection des cellules mais se résorbe lorsque l'aiguille est retirée. Le dénombrement des cellules permet de déterminer l'injection de  $1.7 \pm 0.3 \times 10^7$  cellules mononucléées marquées au DAPI.

L'expression de la chaîne lourde de la myosine squelettique (MY32) est détectée à 3 semaines post-implantation dans 8 animaux sur 8, ce qui confirme la survie cellulaire et l'expression myogénique des cellules implantées. De larges surfaces de greffon (de 2 à 9 mm de diamètre) ou de discrets foyers sont observés à l'intérieur de la paroi du myocarde (Figure 1).

Des cellules isolées sont aussi observées dans le tissu adipeux du péricarde. À l'intérieur de la paroi du myocarde, les fibres positives pour l'expression de MY32 sont généralement alignées avec des cardiomyocytes natifs. Certaines de ces fibres sont fortement marquées à l'anticorps dirigé contre MY32, alors  
5 que d'autres ne sont que faiblement marquées (Figure 2). Ces fibres ne sont pas couplées électro-mécaniquement entre elles ou avec les cardiomyocytes natifs tel que démontré par immunohistochimie négative à la connexine-43.

Les cellules implantées développent des sarcomères organisés et présentent soit une morphologie allongée caractéristique de myotubes  
10 multinucléés fusionnés, soit une morphologie qui demeure mononucléée (Figure 3). Ces cellules du muscle squelettique possèdent des noyaux observés en périphérie ou au centre. Une fibrose de remplacement et des régions présentant des cellules mononucléées de la réponse inflammatoire sont aussi observées.

15 Aucun marquage au DAPI n'est observé dans les cœurs explantés. Ceci peut être dû à une division cellulaire active entraînant une dilution du DAPI. En effet, dans les cultures cellulaires servant de témoins, le DAPI devient indétectable après 6 à 8 doublements de population cellulaire.

Les boîtes de culture servant de témoins sont observées  
20 quotidiennement. L'immunodétection du facteur de régulation spécifique du muscle squelettique MyoD montrent qu'approximativement 50% des cellules en culture sont des cellules précurseurs du muscle squelettique. Quand on permet aux cellules de fusionner, toutes les cellules montrent de nombreux myotubes une semaine suivant l'ensemencement.

25 Bien que des modes de réalisation préférés de l'invention aient été décrits en détails ci-dessus et illustrés dans les dessins annexés, l'invention n'est pas limitée à ces seuls modes de réalisation et plusieurs changements et modifications peuvent y être effectués par une personne du métier sans sortir du cadre ou de l'esprit de l'invention.

**REVENDICATIONS**

1°) Procédé de préparation de cellules souches humaines ou animales, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement en :

- l'extraction cellulaire
- 5       - la dissociation mécanique
- la dissociation enzymatique
- le maintien des cellules obtenues dans un milieu de culture spécifique permettant de préserver la diversité et la plasticité, ledit procédé excluant la mise en culture des cellules.

10       2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture spécifique comprend au moins :

- a) un milieu nutritif;
- b) un facteur protecteur;
- c) des hormones;
- 15       d) des facteurs inhibant la différenciation.

3°) Procédé de préparation de cellules souches selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites cellules souches sont des cellules souches animales ou humaines choisies dans le groupe constitué par des cellules souches progénitrices d'un tissu.

20       4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le tissu est choisi dans le groupe constitué par la peau, le foie, le cœur, l'os et les tissus nerveux.

5°) Utilisation des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour  
25 la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies par thérapie cellulaire ou thérapie génique.

6°) Cellule souche obtenue selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 4.

7°) Méthode de traitement comprenant une étape  
30 d'implantation de cellules souches animales autologues ou hétérologues obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 4 chez un animal.

8°) Composition cellulaire comprenant des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 4.

- 5 9°) Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que les cellules souches ont une capacité de colonisation et une capacité à permettre une récupération fonctionnelle.

1 / 5



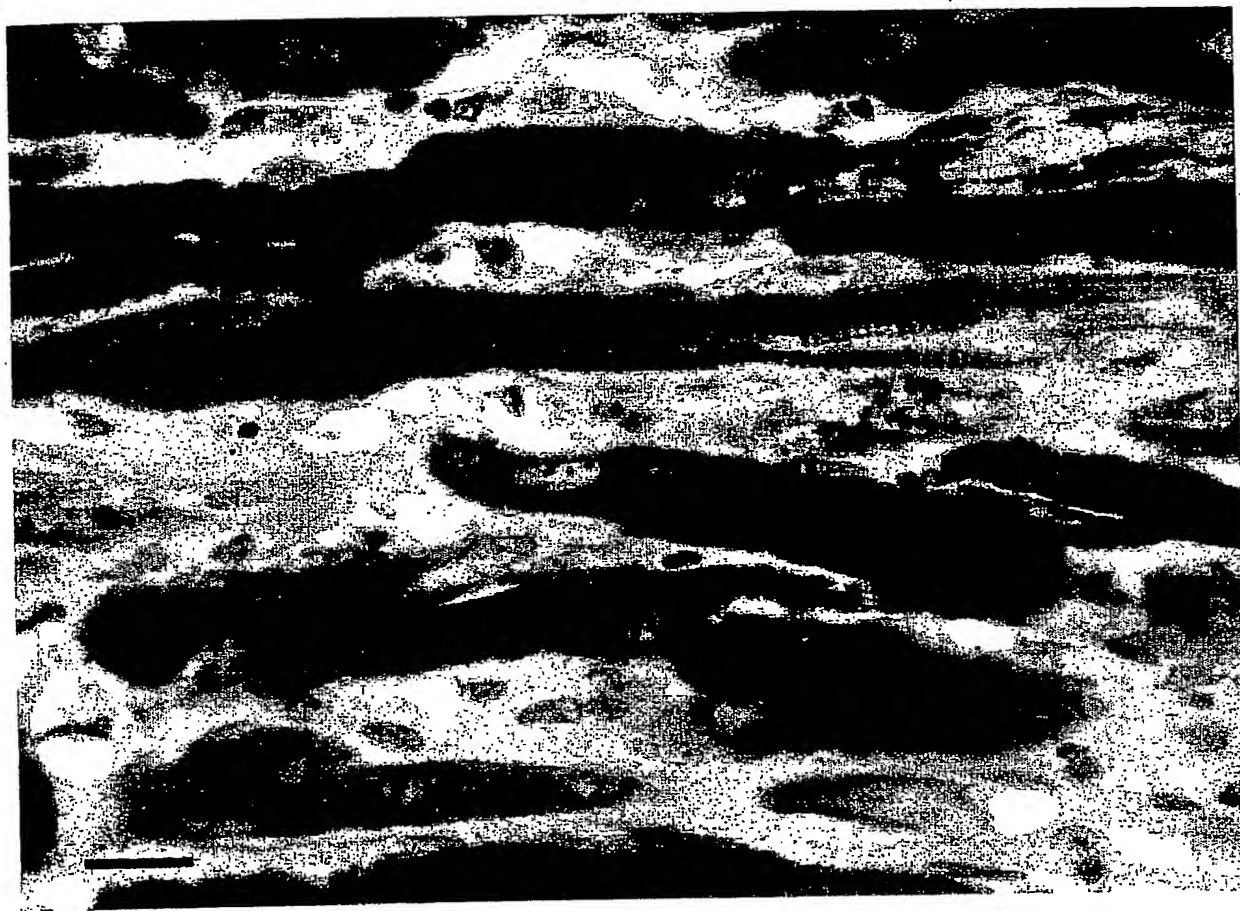
**FIG. 1**

2/5



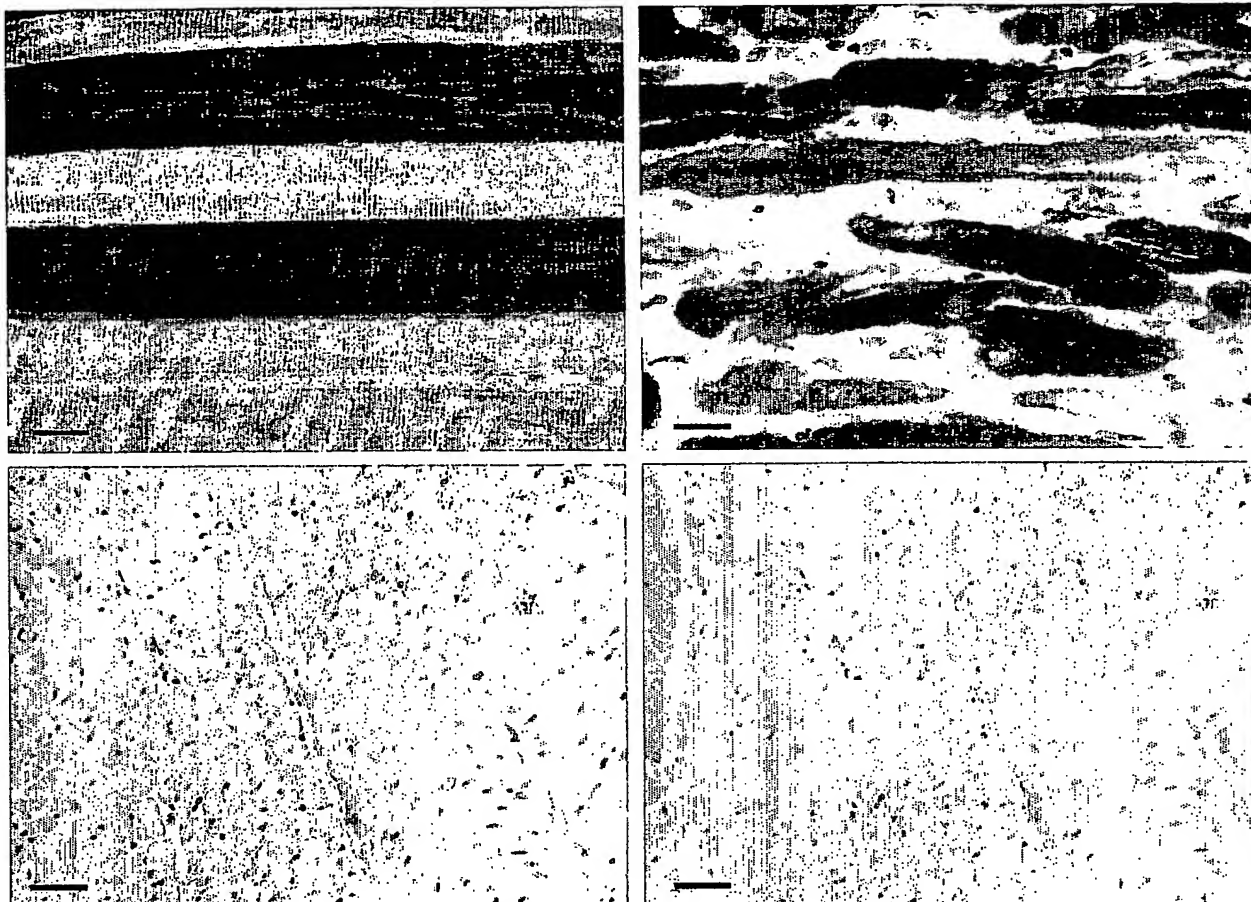
**FIG. 2**

3 / 5



**FIG. 3**

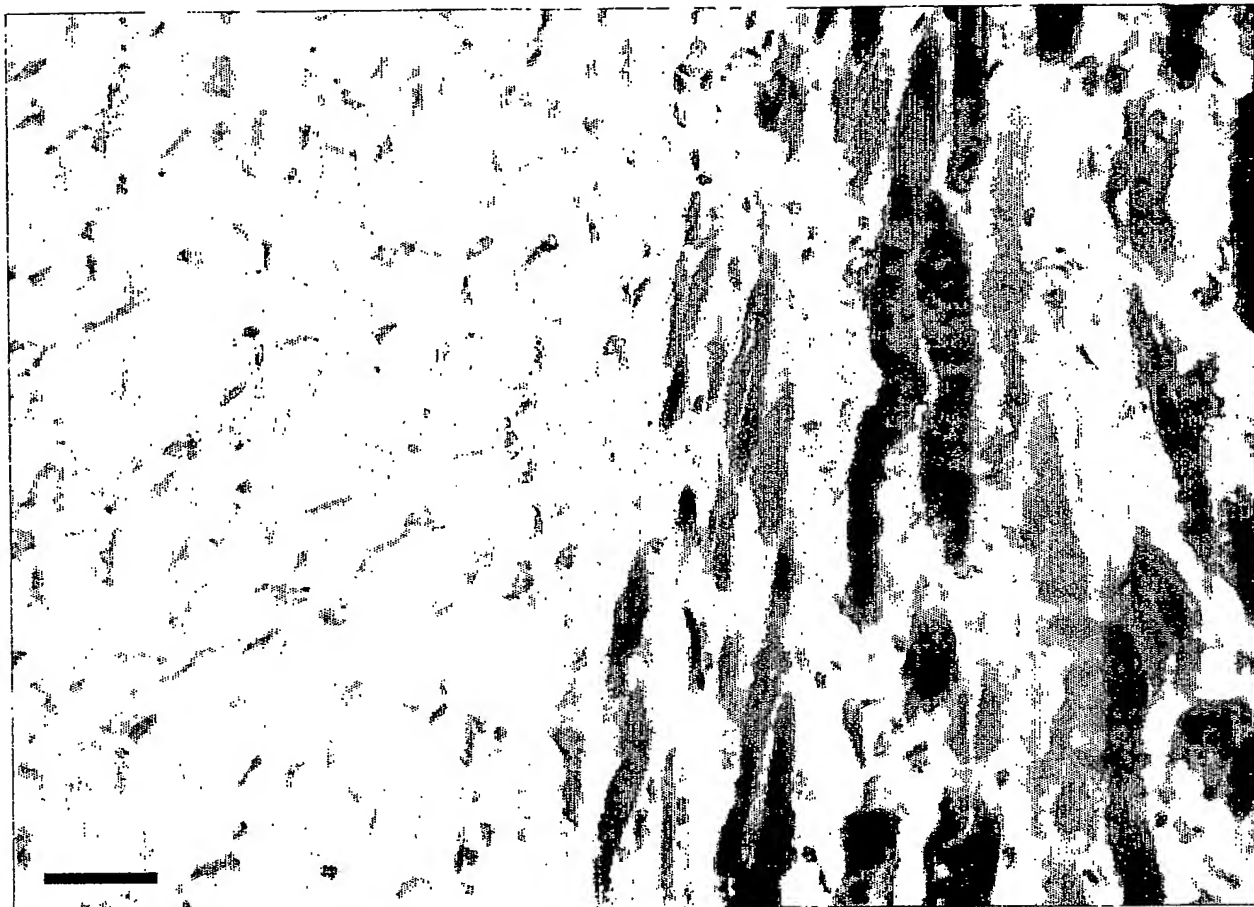
4 / 5



**FIG. 4**



5 / 5



**FIG. 5**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 janvier 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/003181 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Péters-  
bourg, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002010

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 27 juin 2003 (27.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
2,391,638 28 juin 2002 (28.06.2002) CA

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28 rue du Docteur  
Roux, F-75724 Cedex 15 PARIS (FR). CELOGOS  
[FR/FR]; 25-28 rue du Docteur Roux, F-75015 PARIS  
(FR). FONDATION DE L'AVENIR [FR/FR]; 28 rue  
Beaunier, F-75014 PARIS (FR). CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue  
Michel-Ange, F-75794 Cedex 16 PARIS (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 15 avril 2004

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : MONTAR-  
RAS, Didier [FR/FR]; 48 rue Ernest Renan, F-92310  
SEVRES (FR). BORENSTEIN, Nicolas [FR/FR]; 28  
rue Beaunier, F-75014 PARIS (FR). PINSET, Christian  
[FR/FR]; 2 rue Doudeauville, F-75018 PARIS (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ANIMAL OR HUMAN ADULT STEM CELLS AND THERAPEUTIC USE THEREOF

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE CELLULES SOUCHES ADULTES ANIMALES OU HUMAINES ET UTILI-  
SATION DESDITES CELLULES SOUCHES EN THERAPIE.

(57) Abstract: The invention relates to tissue regeneration and repair by cell transplant. More particularly, the invention concerns a method for preparing adult stem cells which preserves the diversity and plasticity of said cells. The invention also concerns the use of said stem cells obtained by the inventive extraction method for therapeutic uses, including gene and cell therapy. The inventive preparation method essentially consists in: cell extraction, mechanical dissociation, enzymatic dissociation, maintaining the cells obtained in a specific culture medium enabling preservation of diversity and plasticity, said method excluding cell culture.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au domaine de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellulaire. Plus particulièrement, la présente invention vise un procédé de préparation de cellules souches adultes qui préserve la diversité et la plasticité de ces cellules. La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé d'extraction proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique et cellulaire. Le procédé de préparation selon l'invention consiste essentiellement en : l'extraction cellulaire, la dissociation mécanique, la dissociation enzymatique, le maintien des cellules obtenues dans un milieu de culture spécifique permettant de préserver la diversité et la plasticité, ledit procédé excluant la mise en culture des cellules.

WO 2004/003181 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

10/517774  
International Application No

PCT/FR 03/02010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIMARIO JOSEPH X ET AL: "Differences in the developmental fate of cultured and noncultured myoblasts when transplanted into embryonic limbs" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 216, no. 2, 1995, pages 431-442, XP002264234 ISSN: 0014-4827 abstract page 432, column 1, last paragraph -column 2, paragraph 1 page 440, column 2, last paragraph -page 441, column 2, last paragraph --- -/--	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2003

Date of mailing of the international search report

30/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dumont, E

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02010

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 36482 A (MIGNONE JOHN ;COLD SPRING HARBOR LAB (US); ENIKOLOPOV GRIGORI N (U) 25 May 2001 (2001-05-25) cited in the application abstract page 1, line 12 - line 26 page 21, line 22 - line 27 example 8 claims 26,28,37 ---	1-9
X	POUZET BRUNO ET AL: "Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: Can tissue processing be optimized?" CIRCULATION, vol. 102, no. 19 Supplement, 7 November 2000 (2000-11-07), pages III.210-III.215, XP002264235 ISSN: 0009-7322 Abrégé;Méthodes; Discussion ---	1-4,6,8,9
P,X	BORENSTEIN NICOLAS ET AL: "Noncultured, autologous, skeletal muscle cells can successfully engraft into ovine myocardium." CIRCULATION, vol. 107, no. 24, 24 June 2003 (2003-06-24), pages 3088-3092, XP009022294 ISSN: 0009-7322 (ISSN print) the whole document ---	1-9
A	WO 99 20740 A (BODNAR ANDREA G ;CHIU CHOY PIK (US); GOLD JOSEPH D (US); MURAI JAM) 29 April 1999 (1999-04-29) abstract page 7, line 19 -page 11, line 3 page 14, line 18 -page 15, line 11 ---	1-9
A	SUZUKI KEN ET AL: "Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart." THE JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY. UNITED STATES MAY 2002, vol. 123, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 984-992, XP009022528 ISSN: 0022-5223 abstract page 991, last paragraph --- -/--	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02010

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ORLIC D ET AL: "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium"  NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB,  vol. 410, 5 April 2001 (2001-04-05), pages 701-705, XP002965971  ISSN: 0028-0836  abstract</p> <p>-----</p>	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02010

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**SEE SUPPLEMENTARY SHEET PCT/ISA/210 FURTHER INFORMATIONS**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I.1

Although claims 1-4 and 7 relate to a method for surgical treatment of the human or animal body, they have been fully searched.

## Continuation of Box I.1

PCT Rule 39.1(iv) – Method for surgical treatment of the human or animal body.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02010

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136482	A	25-05-2001	AU 1603701 A	30-05-2001
			CA 2392051 A1	25-05-2001
			CN 1411470 T	16-04-2003
			EP 1235857 A1	04-09-2002
			JP 2003514550 T	22-04-2003
			WO 0136482 A1	25-05-2001
			US 2002178460 A1	28-11-2002
<hr/>				
WO 9920740	A	29-04-1999	AU 1197699 A	10-05-1999
			AU 729377 B2	01-02-2001
			AU 1277199 A	10-05-1999
			CA 2307807 A1	29-04-1999
			EP 1025204 A1	09-08-2000
			JP 2001017163 A	23-01-2001
			JP 2001520036 T	30-10-2001
			WO 9920740 A2	29-04-1999
			WO 9920741 A1	29-04-1999
			US 2003175956 A1	18-09-2003



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02010

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DIMARIO JOSEPH X ET AL: "Differences in the developmental fate of cultured and noncultured myoblasts when transplanted into embryonic limbs"</p> <p>EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 216, no. 2, 1995, pages 431-442, XP002264234 ISSN: 0014-4827 abrégé page 432, colonne 1, dernier alinéa -colonne 2, alinéa 1 page 440, colonne 2, dernier alinéa -page 441, colonne 2, dernier alinéa</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-9

☒ X

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ X

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 décembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Dumont, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 01 36482 A (MIGNONE JOHN ; COLD SPRING HARBOR LAB (US); ENIKOLOPOV GRIGORI N (U) 25 mai 2001 (2001-05-25) cité dans la demande abrégé page 1, ligne 12 - ligne 26 page 21, ligne 22 - ligne 27 exemple 8 revendications 26, 28, 37</p>	1-9
X	<p>POUZET BRUNO ET AL: "Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: Can tissue processing be optimized?" CIRCULATION, vol. 102, no. 19 Supplement, 7 novembre 2000 (2000-11-07), pages III.210-III.215, XP002264235 ISSN: 0009-7322 Abrégé; Méthodes; Discussion</p>	1-4, 6, 8, 9
P, X	<p>BORENSTEIN NICOLAS ET AL: "Noncultured, autologous, skeletal muscle cells can successfully engraft into ovine myocardium." CIRCULATION, vol. 107, no. 24, 24 juin 2003 (2003-06-24), pages 3088-3092, XP009022294 ISSN: 0009-7322 (ISSN print) le document en entier</p>	1-9
A	<p>WO 99 20740 A (BODNAR ANDREA G ; CHIU CHOY PIK (US); GOLD JOSEPH D (US); MURAI JAM) 29 avril 1999 (1999-04-29) abrégé page 7, ligne 19 - page 11, ligne 3 page 14, ligne 18 - page 15, ligne 11</p>	1-9
A	<p>SUZUKI KEN ET AL: "Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart." THE JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY. UNITED STATES MAY 2002, vol. 123, no. 5, mai 2002 (2002-05), pages 984-992, XP009022528 ISSN: 0022-5223 abrégé page 991, dernier alinéa</p>	1-9

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02010

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ORLIC D ET AL: "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium"  NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB,  vol. 410, 5 avril 2001 (2001-04-05), pages 701-705, XP002965971  ISSN: 0028-0836  abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9

**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> —  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.1

Bien que les revendications 1-4 et 7 concernent une méthode de traitement chirurgical du corps humain/animal, une recherche complète a été effectuée.

-----

Suite du cadre I.1

Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement chirurgical du corps humain ou animal

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/02010

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0136482	A	25-05-2001	AU 1603701 A	30-05-2001
			CA 2392051 A1	25-05-2001
			CN 1411470 T	16-04-2003
			EP 1235857 A1	04-09-2002
			JP 2003514550 T	22-04-2003
			WO 0136482 A1	25-05-2001
			US 2002178460 A1	28-11-2002
WO 9920740	A	29-04-1999	AU 1197699 A	10-05-1999
			AU 729377 B2	01-02-2001
			AU 1277199 A	10-05-1999
			CA 2307807 A1	29-04-1999
			EP 1025204 A1	09-08-2000
			JP 2001017163 A	23-01-2001
			JP 2001520036 T	30-10-2001
			WO 9920740 A2	29-04-1999
			WO 9920741 A1	29-04-1999
			US 2003175956 A1	18-09-2003